

На правах рукописи



Гомзикова Марина Олеговна

**ОЦЕНКА ПРОАНГИОГЕННЫХ СВОЙСТВ МЕМБРАННЫХ
ВЕЗИКУЛ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ЦИТОХАЛАЗИНА В**

03.01.04 – биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2016

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, доцент

– **Ризванов Альберт Анатольевич**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, заведующий лаборатории
молекулярной и клеточной биологии НИТИ им. С.П. Капицы,
ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет»

– **Саенко Юрий Владимирович;**

доктор медицинских наук, профессор кафедры общей патологии
ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет»,

– **Зубаирова Ляйли Дияверовна**

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук.

Защита состоится «22» сентября 2016 г. в 13:00 часов на заседании Диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. К.Маркса, 74, в зале заседания ученого совета (аудитория 205А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» www.kpfu.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор



Абрамова З.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Изучение молекулярных механизмов передачи информации в биологических системах является важной биохимической задачей. В настоящее время общепризнанно, что клетки способны передавать сигналы не только через непосредственный контакт поверхностных рецепторов и/или посредством растворимых секретируемых факторов, но и посредством внеклеточных везикул, окруженных цитоплазматической мембраной (ЦПМ) (Кореньков Д.А. // Цитология. 2014. Т.56). Современные открытия в области межклеточной коммуникации требуют исследования строения, свойств и функционирования биомолекул, заключенных внутри надмолекулярных комплексов – везикул клеток человека, которые служат векторами внутри организма, участвуя в передаче информации между клетками. Однако наше понимание процесса обмена информацией между клетками, особенно опосредованного везикулами, остается весьма ограниченным.

Одним из наиболее перспективных подходов стимуляции процессов регенерации и ангиогенеза при травматическом или ишемическом повреждении тканей считают клеточную терапию с применением стволовых клеток (СК) человека. Однако остается риск дифференцировки трансплантированных СК в нежелательном направлении *in vivo*. Существуют примеры дифференцировки трансплантированных мезенхимных стволовых клеток (МСК) в адипогенном направлении в почках (Kunter et al. // J Am Soc Nephrol. 2007. V.18.) и в остеогенном направлении в сердце (Breitbach et al. // Blood. 2007. V.110.). Еще одним вопросом, связанным с применением СК взрослого организма, является возможность их онкологической трансформации при культивировании и экспансии *in vitro/ex vivo* (Rosland et al. // Cancer Res. 2009. V.69.). Направленная генетическая модификация клеток человека *in vitro* также может приводить к онкологической трансформации за счет вставочного мутагенеза и активации онкогенов (Steinemann et al. // Am J Stem Cells. 2013. V.2.). В этой связи особую актуальность приобретают технологии, способные снижать потенциальные риски клеточной и генно-клеточной терапии.

Одна из гипотез, объясняющая благоприятный эффект после проведения клеточной терапии, основана на способности СК к стимуляции клеток микроокружения путем непосредственного межклеточного контакта, секреции во внеклеточное пространство биологически активных молекул, а также путем высвобождения внеклеточных везикул (Rani et al. // Mol Ther. 2015. V.23.). Несмотря на многолетние исследования терапевтического потенциала СК,

комплексный вклад межклеточной коммуникации СК в процессы регенерации остается недостаточно исследованным.

В связи с упомянутыми выше проблемами биобезопасности применения СК, актуальным представляется применение препаратов на основе внеклеточных везикул СК, не содержащих способных к онкологической трансформации клеток, с целью стимуляции регенерации. На различных экспериментальных моделях показано ингибирование апоптоза и стимуляция пролиферации клеток под действием внеклеточных везикул СК (Bruno et al. // PLoS One. 2012. V.7.). В этой связи использование везикул клеток человека, которые являются естественными векторами нашего организма, в качестве терапевтического инструмента для стимуляции регенерации и ангиогенеза является крайне перспективным. Однако существует неразрешенная на сегодняшний день проблема: количество естественно выделяемых внеклеточных везикул ограничено и не достаточно для широкого терапевтического применения (Biancone et al. // Nephrol Dial Transplant. 2012. V.27.).

Известно, что процесс высвобождения мембранных везикул от поверхности клетки требует молекулярных изменений внутри клетки, нарушающих связь ЦПМ с цитоскелетом и дезорганизацию цитоскелета (Puddu et al. // Can J Cardiol. 2010. V.26; Morel et al. // Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011. V.31.). Таким образом, исследования молекулярных механизмов реагирования клеточных компонентов на химические воздействия, вызывающие дестабилизацию цитоскелета клетки, представляют особенный интерес. Одними из наиболее исследованных химических веществ, которые вызывают дезорганизацию актинового цитоскелета, являются цитохалазины открытые в 1967 году (Carter // Nature. 1967. V.213; D. C. Aldridge // Royal Society of chemistry. 1967). Поскольку цитохалазины не влияют на жизнеспособность клеток и не запускают апоптоз в клетках животных и человека (Prescott et al. // Exp Cell Res. 1972. V.71; Mao et al. // Nano Lett. 2011. V.11; Peng et al. // ACS Appl Mater Interfaces. 2015), они являются перспективными кандидатами для использования в целях стимуляции высвобождения внеклеточных везикул. Например, было обнаружено, что дезорганизация цитоскелета клеток человека линии HT29 химическим веществом – цитохалазином D, значительно увеличивает количество высвобождаемых внеклеточных везикул (Choi et al. // J Proteome Res. 2012. V.11.).

Pick et al. в 2004 году предложили применять к клеткам, обработанным цитохалазином В, механическую силу с целью стимуляции образования мембранных везикул (Pick et al. // J Am Chem Soc. 2005. V.127.). В дальнейшем Mao et al. в 2011 году предложили использовать везикулы, полученные от обработанных

цитохалазином В клеток человека, в качестве векторов для доставки химических веществ и наночастиц (Mao et al. // Nano Lett. 2011. V.11.). Мембранные везикулы являются биосовместимыми векторами, так как окружены естественной ЦПМ клетки. Кроме того, ЦПМ клеточного происхождения защищает содержимое везикул от деградации внеклеточными ферментами.

Таким образом, молекулярные механизмы передачи информации в биологических системах и роль мембранных везикул в регенеративных процессах представляют огромный фундаментальный и практический интерес. Именно отсутствие глубокого понимания механизмов опосредованной везикулами межклеточной коммуникации является основной причиной, ограничивающей применение мембранных везикул в биомедицине для стимуляции регенерации. В этой связи возможность использования мембранных везикул, полученных с помощью цитохалазина В, в качестве нового терапевтического инструмента представляет также и несомненный практический интерес.

Цель работы - характеристика биохимического состава и оценка векторных свойств и биологической активности мембранных везикул клеток человека.

Задачи исследования:

1. Получить мембранные везикулы от клеток человека HEK293FT, обработанных цитохалазином В, и исследовать размер и молекулярный состав мембранных везикул;
2. Исследовать взаимодействие и механизм доставки содержимого мембранных везикул в клетку-реципиента;
3. Исследовать проангиогенные свойства мембранных везикул, полученных от клеток человека, обладающих повышенной ангиогенной активностью - SH-SY5Y и МСК;
4. Оценить влияние различных условий хранения на целостность и способность к доставке своего содержимого мембранных везикул, полученных от МСК человека с помощью цитохалазина В.

Научная новизна

В результате получения и исследования применимости мембранных везикул из клеток человека, обработанных цитохалазином В, для стимуляции ангиогенеза определены морфология, размер и молекулярный состав мембранных везикул. Методом электронной микроскопии, которая является общепризнанным стандартом для измерения размера микро- и наноструктур, впервые установлено, что размер мембранных везикул, получаемых с помощью цитохалазина В (МВ-ЦВ), составляет от менее 100 нм до 1800 нм с пиком в области 100-600 нм. Впервые показано, что МВ-ЦВ содержат в своем составе молекулы актина и

генетический материал митохондрий клетки. Несомненной новизной обладают данные по исследованию синтеза белка внутри МВ-ЦВ с использованием аналога метионина – L-азидогомоаланина. Впервые показано, что среди общего пула встречаются отдельные МВ-ЦВ, способные поддерживать синтез белка. Приоритетными являются данные о механизме доставки содержимого МВ-ЦВ в клетку-реципиента. Установлено, что доставка посредством МВ-ЦВ происходит путем непосредственного слияния мембран, а также путем эндоцитоза. Впервые установлена зависимость эффективности доставки от количества нанесенных МВ-ЦВ и от концентрации загруженных в них веществ. Впервые показан перенос плазмидной ДНК посредством МВ-ЦВ, при этом плазмидная ДНК была способна выступать в качестве матрицы для транскрипции и последующей трансляции в клетках-реципиентах. Принципиально новыми являются данные о том, что МВ-ЦВ заключают биоактивные молекулы (факторы роста, цитокины, хемокины) клеток-доноров. МВ-ЦВ, полученные от клеток с повышенной проангиогенной активностью (опухолевые и стволовые клетки человека), способны стимулировать формирование капилляро-подобных структур на внеклеточном матриксе Matrigel *in vitro* и ангиогенез *in vivo*. Несомненной новизной обладают данные по влиянию различных условий хранения на морфологию, целостность и способность к доставке содержимого МВ-ЦВ.

Научно-практическая значимость работы

Настоящая работа расширяет знания о молекулярных механизмах реагирования клеточных компонентов на химическое воздействие цитохалазином В. В ходе выполнения работы разными методами была охарактеризована морфология, размер и молекулярный состав мембранных везикул клеток человека, полученных с помощью цитохалазина В, что позволило глубже изучить данные надмолекулярные комплексы. Это в свою очередь будет способствовать развитию практических подходов с использованием везикулярных систем.

Полученные результаты расширяют представления о возможностях терапевтического применения мембранных везикул, полученных с помощью цитохалазина В. Обнаруженная нами способность мембранных везикул к слиянию и доставке генетической информации в клетку-реципиента открывает перспективу использования МВ-ЦВ в качестве новой векторной системы в генной терапии. Кроме того, нами показано, что МВ-ЦВ проявляют биологическую активность клеток-доноров и способны стимулировать формирование капилляро-подобных структур HUVEC на матриксе Matrigel *in vitro* и ангиогенез *in vivo*. Это может быть использовано для терапевтической стимуляции ангиогенеза при ишемических повреждениях тканей человека. В результате исследовательской работы была

подана заявка на выдачу патента на изобретение «Способ получения лекарственного препарата на основе везикул клеток человека» в раздел А61К согласно международной патентной классификации (заявка №2015131280).

Используемые в работе методические подходы позволяют получать мембранные везикулы в больших количествах, что совместно с проведенными нами параллелями между механизмом образования, размером, составом и биологической активностью МВ-ЦВ и естественных микровезикул, позволит использовать МВ-ЦВ в качестве модельной системы в области исследования молекулярных механизмов передачи информации в биологических системах. В целом результаты настоящей работы, полученные в области исследования биологической активности МВ-ЦВ СК, будут способствовать развитию теории паракринной стимуляции клеток микроокружения стволовыми клетками.

Положения, выносимые на защиту:

1. Мембранные везикулы, получаемые с помощью цитохалазина В, включают цитоплазматическое содержимое клеток-доноров, в частности молекулы актина, митохондриальную ДНК, компоненты и исходные молекулы, необходимые для синтеза белка, а также различные факторы роста, цитокины и хемокины.

2. Доставка содержимого мембранных везикул внутрь клетки-реципиента происходит путем непосредственного слияния мембран и эндоцитоза.

3. Мембранные везикулы, полученные от клеток-доноров, обладающих повышенной ангиогенной активностью – SH-SY5Y и МСК, стимулируют ангиогенез *in vitro* и *in vivo*.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на следующих всероссийских и международных симпозиумах, конгрессах и конференциях: VI международный симпозиум «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий» (Москва, 2013); IV международная научно-практическая конференция "Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине" (Казань, 2014); международная научно-практическая конференция "Актуальные вопросы образования и науки" (Тамбов, 2014); 19 международная пушинская школа-конференция «Биология-наука XXI века» (Пушино, 2015); 18 международный симпозиум биологов Европы «Symbiose» (Греция, 2015); международная научно-практическая конференция «Наука и образование третьего тысячелетия» (Москва, 2015).

Место выполнения работы и личный вклад соискателя

Экспериментальные данные получены автором на базе института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета. Автор принимал участие в определении цели исследовательской работы. Автор лично планировал и проводил эксперименты в соответствии с поставленными задачами работы. Полученные результаты автор лично описывал и обсуждал. Автор проводил сравнительный анализ полученных им результатов с данными, представленными в научной литературе. Автор принимал активное участие в написании статей.

Структура и объем работы

Материалы диссертационной работы изложены на 171 страницах машинописного текста. Работа содержит 29 рисунков и 4 таблицы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Библиография включает 201 источник, среди которых 11 отечественных и 190 зарубежных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Клеточные культуры, культивирование. В работе использовали клеточные линии HEK293FT (ATCC CRL-11268), SH-SY5Y (ATCC CRL-2266), МСК, выделенные из жировой ткани здоровых доноров (МСК-ЖТ), которая была получена в ходе плановой липосакции. Клеточные линии поддерживали на среде Игла, модифицированной по методу Дульбекко (ПанЭко, Россия), МСК-ЖТ – на среде α -MEM (ПанЭко, Россия).

Получение мембранных везикул от клеток человека, обработанных цитохалазином В. Инкубировали клетки человека в DMEM без сыворотки крови, содержащей 10 μ г/мл цитохалазина В (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Подвергали клетки активному перемешиванию в течение 30 секунд. Далее осуществляли серию последовательных центрифугирований: 500 об/мин 10 мин, 500 об/мин 20 минут, 3000 об/мин 25 минут. Осадок МВ-ЦВ отмывали большим количеством ФСБ.

Подготовка МВ-ЦВ и проведение трансмиссионной электронной микроскопии. МВ-ЦВ фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом, постфиксировали 1% тетроксидом осмия, обезвоживали в возрастающих концентрациях спирта, ацетоне и оксипропилене, заключали в эпоксидную смолу. Контрастировали в уранил ацетате и цитрате свинца (Химмед, Россия).

Подготовка МВ-ЦВ и проведение сканирующей электронной микроскопии. МВ-ЦВ на стеклах фиксировали с помощью 10% формалина 15

мин. Обезвоживали в возрастающих концентрациях спирта, высушивали при 37°C, проводили напыление слоя золота/палладий и анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа Merlin (Carl Zeiss, Германия).

Окрашивание мембранных везикул и клеток красителем, специфичным к актину. Клетки/МВ-ЦВ НЕК293FT на стеклах фиксировали 10% раствором формалина 15 мин. Пермебиализировали с помощью 0,1% Tween 20 в течение 15 мин. Наносили краситель Phalloidin (SantaCruz, США) на 15 мин. Анализировали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM780 (Carl Zeiss, Германия).

Детекция процесса синтеза белка. Клетки/МВ-ЦВ НЕК293FT инкубировали в DMEM без метионина (кат. 21013024, Life technologies, США), содержащую L-азидогомоаланин (кат.№ C10289, Life technologies, США) при 37°C, 5% CO₂ в течение 30 мин. Фиксировали клетки/МВ-ЦВ 10% формалином 15 мин, пермебиализировали 0,1% Tween20 в течение 15 мин. Детектировали с помощью набора Click-iT® АНА Alexa Fluor® 488 (кат.№ C10289, Life technologies, США).

Исследование стабильности МВ-ЦВ. МВ-ЦВ МСК-ЖТ, окрашенные 10µМ CFDA SE (eBioscience, США), были разделены на аликвоты по 250 µг/мл белка. МВ-ЦВ подвергали хранению в различных условиях: 1) в сыворотке крови человека при 37°C; 2) в ФСБ при 4 или 25°C; 3) в ФСБ подвергали замораживанию при -20°C; 4) подвергали лиофильному высушиванию.

Выделение тотальной ДНК и проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР). МВ-ЦВ обрабатывали ДНКазой I (ThermoFisher, США) в концентрации 10µг/мл в течение 30 мин при 37°C. Лизировали в буфере (50 нМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl pH8, 10 мМ ЭДТА pH8, 1% ДСН) + 300 мкг/мл протеиназы К (ThermoScientific, США). Выделение ДНК осуществляли с помощью фенол-хлороформного метода. В ПЦР использовали пары праймеров специфичных к последовательностям генов 18S рРНК (прямой: TAC CTG GTT GAT TCT GCC AGT; обратный: ATT ACC GCG GCT GCT), цитохромоксидазы I (ЦО I) (GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G / TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA), EGFP (TCG GTA CCA TGG TGA GCA AGG GCG AG / GTC TCG AGT TAT TGT ACA GCT CGT CCA TGC) (Синтол, Россия).

Выделение и измерение концентрации белка методом бицинхониновой кислоты. К осадку клеток/МВ-ЦВ добавляли лизирующий раствор (50мМ Tris-HCl pH 7.4, 1% NP 40, 0,5% дезоксихалата натрия, 0,1% ДСН, 150 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА). Для исследования клеток/МВ-ЦВ методом мультиплексного анализа, использовали лизирующий раствор (50мМ Hepes pH 7.9, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,5% NP 40, 10% глицерола). Концентрацию белка определяли с

использованием коммерческого набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Иммуноблоттинг. Перенос белков на PVDF-мембрану (BioRad, США) осуществляли с использованием системы полусухого переноса Semi-Dry Transfer (BioRad, США). Окрашивали первичными антителами VEGF (кат.№sc-152 SantaCruz, США) 1:100, FGF2 (кат.№F5180 Sigma, США) 1:200, β -actin (GenScript, США) 1:1000. Затем окрашивали вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Детекцию белков производили с помощью Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Окрашивание мембранными красителями, CFDA SE и иммуноокрашивание клеток человека. Добавляли мембранные красители DiD/DiO (кат.№ V22889, Life technologies, США) до конечной концентрации 5 μ M, CFDA SE (кат.№ 65-0850-84, eBioscience, США) - до 2,5 или 10 μ M. Инкубировали клетки при 37°C в течение 15 минут. Иммуноокрашивание проводили с использованием антитела к антигену CD90 (кат.№ 328112, Biolegend, США) в разведении 1:200.

Формирование капилляро-подобных структур эндотелиальными клетками пупочной вены человека на матриксе Matrigel *in vitro*. Высевали 2×10^4 HUVEC 3 пассажа в 96-луночный планшет, лунки которого предварительно были покрыты матриксом Matrigel. Проводили ко-культивирование клеток SH-SY5Y с HUVEC в соотношении 1:1. Наносили на HUVEC MB-ЦВ SH-SY5Y в количестве эквивалентном 2×10^4 клеток SH-SY5Y в пересчете на общий белок. Формирование капилляро-подобных структур оценивали через 16 часов.

Подкожная инъекция мембранных везикул и клеток человека в матриксе Matrigel лабораторным животным *Rattus norvegicus*. В область флангов живота *Rattus norvegicus* подкожно вводили 2×10^6 клеток SHSY5Y в матриксе, MB-ЦВ SH-SY5Y в количестве эквивалентном 2×10^6 клеток SH-SY5Y, отрицательный контроль - матрикс Matrigel. На 8-е сутки извлекали фрагменты матрикса Matrigel.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета анализа данных Microsoft Excel 2007. Группы сравнивали с использованием t-критерия Стьюдента. Статистически достоверным принималось различие при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Настоящая работа посвящена исследованию морфологии, размера и молекулярного состава MB-ЦВ клеток человека, а также исследованию их биологических и векторных свойств. На первом этапе работы был охарактеризован

способ выделения МВ-ЦВ от линии клеток НЕК293FT. Установлено, что в результате заключительного этапа центрифугирования мы получили фракцию свободную от клеток, ядер и крупных фрагментов клеток, состоящую из округлых везикул, которые, согласно данным флуоресцентной микроскопии, содержат цитоплазматический компонент и не содержат ядра клетки. Методом лазерной конфокальной микроскопии разными авторами было показано, что размер МВ-ЦВ составляет 500-1000 нм (Pick et al. // J Am Chem Soc. 2005. V.127.), 1000-2000 нм (Mao et al. // Nano Lett. 2011. V.11.). Микрофотографии фракции МВ-ЦВ не позволяют точно определить диаметр большей части везикул, что связано с ограниченной разрешающей способностью светового микроскопа (Балезин С.А. // Основы физической и коллоидной химии. 1975) (Мухитов А.Р. // 2011; Mulcahy et al. // J Extracell Vesicles. 2014. V.3.). Для установления точного размера, а также характеристики структуры и морфологии получаемых МВ-ЦВ, мы использовали методы трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии (ТЭМ и СЭМ, соответственно). Согласно данным ТЭМ и СЭМ, получаемые нами структуры представляют собой окруженные ЦПМ везикулы, имеющие сферическую форму и гладкую поверхность (Рисунок 1А, 2А). Установлено, что фракция МВ-ЦВ содержит нано- и микровезикулы, размер которых составляет от менее чем 100 нм до 1800 нм с пиком в области 100-600 нм (76,22%-80% от общего количества МВ-ЦВ) (Рисунок 1Б, 2Б). Согласно литературным данным, размер экзосом клеток человека составляет от 40 до 150 нм (Simpson et al. // Expert Rev Proteomics. 2009. V.6; Raposo et al. // J Cell Biol. 2013. V.200; Ji et al. // PLoS One. 2014. V.9.). Размер естественных микровезикул, которые высвобождаются от поверхности клетки человека составляет 40-2000 нм (van der Pol et al. // Pharmacol Rev. 2012. V.64; Akers et al. // J Neurooncol. 2013. V.113.). Размер апоптотных телец по разным данным составляет 50-5000 нм (van der Pol et al. // Pharmacol Rev. 2012. V.64; Akers et al. // J Neurooncol. 2013. V.113; Ji et al. // PLoS One. 2014. V.9.). Таким образом, по размеру получаемые нами МВ-ЦВ ближе всего располагаются к естественным микровезикулам, высвобождаемым от поверхности клетки человека, чей размер составляет 40-2000 нм по разным данным (van der Pol et al. // Pharmacol Rev. 2012. V.64; Akers et al. // J Neurooncol. 2013. V.113.).

Известно, что применение веществ, нарушающих структуру цитоскелета, вызывает увеличение количества высвобождаемых внеклеточных везикул (Choi et al. // J Proteome Res. 2012. V.11; Atanassoff et al. // PLoS One. 2014. V.9.), так как процесс высвобождения естественных микровезикул клеток человека требует локальной дестабилизации актинового цитоскелета (Morel et al. // Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011. V.31; Azevedo // 2012). В процессе образования

естественные микровезикулы клеток человека захватывают фрагменты актиновых микрофиламентов, что является отличительным признаком микровезикул от экзосом, которые имеют иной механизм образования (Antonyak et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2011. V.108; Kawamoto et al. // PLoS One. 2012. V.7.).

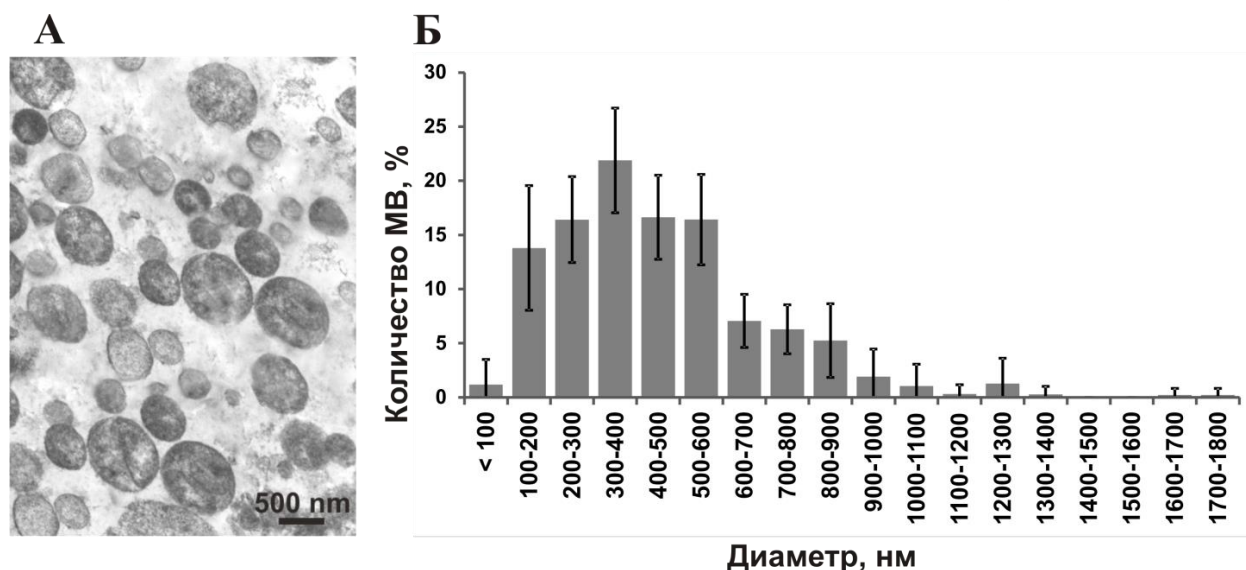


Рисунок 1 - Анализ структуры и размера мембранных везикул, полученных с помощью цитохалазина В, методом трансмиссионной электронной микроскопии. А – структура мембранных везикул. Б – гистограмма, отражающая распределение мембранных везикул по размеру.

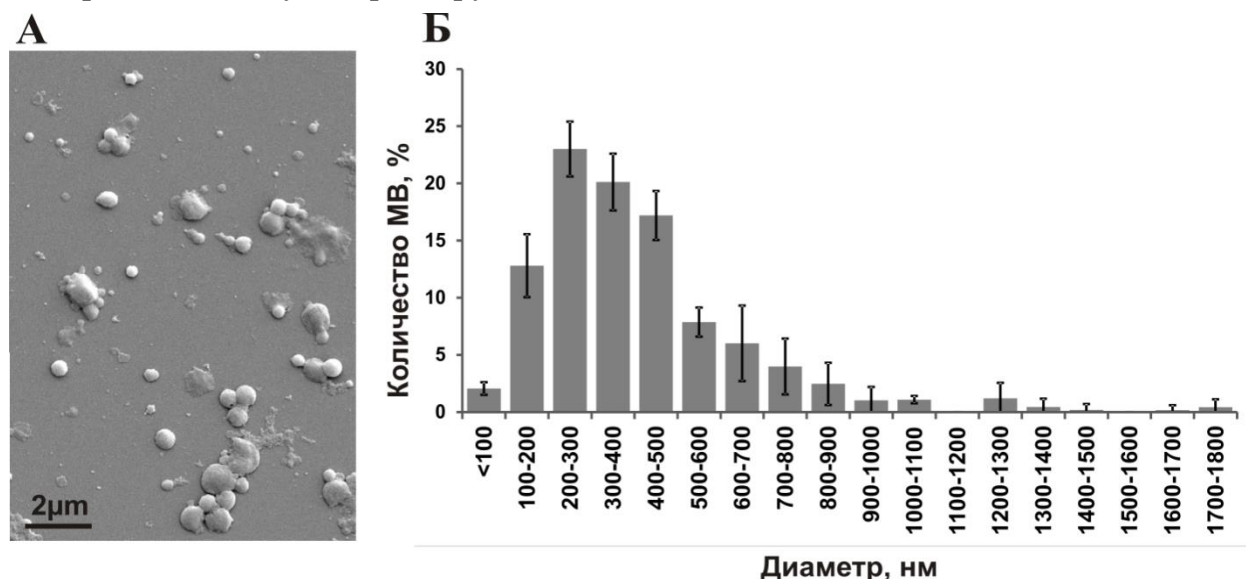


Рисунок 2 - Анализ морфологии и размера мембранных везикул, полученных с помощью цитохалазина В, методом сканирующей электронной микроскопии. А – морфология мембранных везикул. Б – гистограмма, отражающая распределение мембранных везикул по размеру.

В результате проведенных нами исследований установлено, что обработка клеток человека цитохалазином В приводит к дезорганизации актинового

цитоскелета и, как следствие, к потери клетками характерной формы. Актиновый цитоскелет теряет непрерывность, а фрагменты актиновых нитей приобретают вид подмембранных «островков». Получаемые МВ-ЦВ, согласно данным лазерной конфокальной микроскопии и иммуноблоттинга, содержат в своем составе фрагменты актиновых микрофиламентов, подобно естественным микровезикулам клеток человека.

Получаемая нами фракция МВ-ЦВ не содержит клеток, что подтверждено высевом в питательную среду, а также согласно данным электронной микроскопии и ПЦР (Рисунок 3А) не содержит клеточных ядер. Поскольку внеклеточные везикулы заключают цитоплазматическое содержимое клетки-донора, исследователей интересовал вопрос, происходит ли захват органелл клетки, которые также находятся в цитоплазме клетки, в процессе образования внеклеточных везикул. В некоторых внеклеточных везикулах обнаруживается генетический материал митохондрий (Guescini et al. // J Neural Transm. 2010. V.117; Guescini et al. // Exp Cell Res. 2010. V.316.). В этой связи представляло интерес исследование наличия генетического материала митохондрий в МВ-ЦВ. Согласно результатам ПЦР, МВ-ЦВ содержат ген ЦО I (Рисунок 3Б), который находится в геноме митохондрий. Обнаружение в МВ-ЦВ митохондриального генома означает, что существует возможность попадания в МВ-ЦВ цитоплазматических органелл клетки. Действительно, ранее методом флуоресцентной микроскопии вне клетки были обнаружены структуры, окруженные мембраной и содержащие митохондрии, которые, вероятно, представляли собой естественные микровезикулы (Spees et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2006. V.103.).

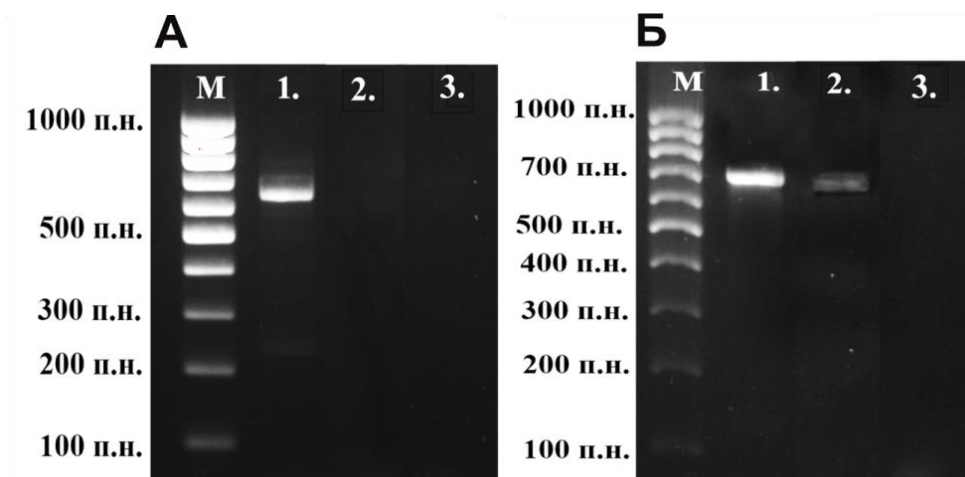


Рисунок 3 - Электрофореграммы продуктов ПЦР при использовании праймеров, специфичных к последовательностям генов 18S рРНК (А) и ЦО I (Б). М – маркер; 1 – клетки-продуценты НЕК293FT; 2 – Мембранные везикулы клеток НЕК293FT; 3 – отрицательный контроль.

Известно, что цитопласты, получаемые с помощью цитохалазина В, остаются жизнеспособны после удаления ядер в течение трех дней (Wise et al. // *Exp Cell Res.* 1973. V.81.), при этом в них происходит синтез белка в течение по меньшей мере 12 часов (Prescott et al. // *Exp Cell Res.* 1972. V.71.). В этой связи представляло интерес исследование способности МВ-ЦВ, представляющих собой уменьшенные цитопласты, поддерживать синтез белка. Путем включения в питательную среду аналога метионина – L-азидогомоаланина и последующей его детекции методом лазерной конфокальной микроскопии, мы установили, что в единичных МВ-ЦВ происходит синтез белка. Следует отметить низкую интенсивность флуоресценции данных МВ-ЦВ. Так как процесс синтеза белка энергозатратный, требующий присутствия определенных компонентов (мРНК, тРНК, рибосомы, ферменты – пептидилтрансфераза и транслоказа, факторы трансляции) и постоянного поступления исходных молекул (АТФ, ГТФ, аминокислоты) (Спирин // Молекулярная биология: рибосомы и биосинтез белка. 2011), которые в небольшом объеме МВ-ЦВ и при отсутствии восполнения быстро расходуются. В результате, детектированные новосинтезированные полипептидные молекулы малочисленны, что обуславливает низкий уровень флуоресценции. В настоящее время нет данных об исследовании процесса синтеза белка внутри естественных внеклеточных везикул. Вероятно, это обусловлено тем, что существует предположение о специфичном сортинге молекул, входящих в состав внеклеточных везикул (Clancy et al. // *Nat Commun.* 2015. V.6; Zhang et al. // *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2015. V.13.), а в случае экзосом еще и небольшим объемом этих структур.

В настоящее время общепризнанно, что внеклеточные везикулы опосредуют межклеточную коммуникацию в организме человека. Везикулы, высвобождаемые клетками-донорами воздействуют на клетки-реципиенты, доставляя свое содержимое внутрь клетки (Valadi et al. // *Nat Cell Biol.* 2007. V.9.). Однако молекулярный механизм доставки содержимого внеклеточных везикул внутрь клетки исследован недостаточно. Существует две гипотезы, объясняющие опосредованную внеклеточными везикулами доставку молекул: 1) непосредственное слияние мембраны везикул и ЦПМ клетки; 2) эндоцитоз. Методом дифференциального окрашивания ЦПМ клеток-реципиентов и мембраны МВ-ЦВ, нами показано, что у 95,88% клеток-реципиентов в составе ЦПМ обнаруживаются участки мембраны МВ-ЦВ, а в подмембранном пространстве и внутри клеток-реципиентов эндоцитозные пузырьки, содержащие МВ-ЦВ. Полученные данные свидетельствуют о том, что доставка молекул посредством МВ-ЦВ в клетку-реципиента происходит двумя путями - непосредственным слиянием мембран и эндоцитозом. В литературе, посвященной исследованию

процесса слияния внеклеточных везикул с клеткой-реципиентом, поднимался вопрос о возможности обмена липидными молекулами между мембраной МВ-ЦВ и ЦПМ клетки-реципиента, без непосредственного слияния мембран, что может приводить к ложноположительным результатам (Mulcahy et al. // J Extracell Vesicles. 2014. V.3.). С целью выявления механизма слияния мембраны МВ-ЦВ и ЦПМ клетки-реципиента, мы исследовали перенос посредством МВ-ЦВ трансмембранных белков клетке-реципиенту. Нами установлено, что 99,14% клеток-реципиентов НЕК293 FT приобрели нехарактерный для данной клеточной линии поверхностный маркер – CD90, который, однако, характерен для клеток-доноров МВ-ЦВ - МСК-ЖТ. Поскольку локализация флуоресцентных сигналов мембраны МВ-ЦВ и конъюгированного с флуоресцентным красителем антитела к CD90 совпадают (Рисунок 4), можно сделать вывод, что произошло встраивание мембраны МВ-ЦВ в ЦПМ клеток-реципиентов.

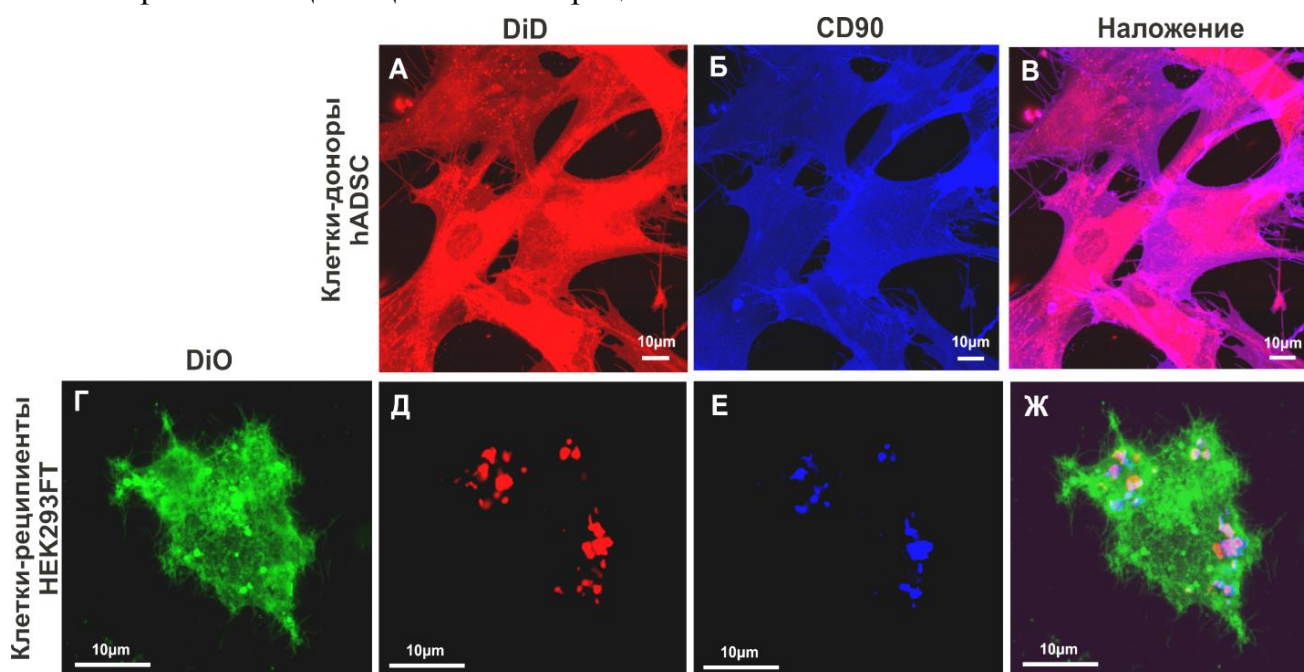


Рисунок 4 - Микрофотографии клеток-доноров мембранных везикул МСК-ЖТ (А-В) и клеток-реципиентов НЕК293FT (Г-Ж). Лазерная конфокальная микроскопия. Флуоресценция в зеленой области спектра – DiO (окрашивание ЦПМ клетки-реципиента); флуоресценция в красной области спектра – DiD (окрашивание ЦПМ мембранных везикул, полученных с помощью цитохалазина В), флуоресценция в синей области спектра – моноклональное антитело к CD90, конъюгированное с флуоресцентной меткой Pacific Blue. Клетки-доноры МСК-ЖТ – клетки, от которых были получены мембранные везикулы с помощью цитохалазина В; клетки-реципиенты НЕК293FT – клетки, на которые наносили мембранные везикулы.

МВ-ЦВ, полученные с помощью цитохалазина В, способны заключать и доставлять флуоресцентный краситель в клетки-реципиенты (Mao et al. // Nano Lett. 2011. V.11.), а также противоопухолевый препарат (доксорубин) в ткани опухоли мыши (Peng et al. // ACS Appl Mater Interfaces. 2015. V.7.). Однако до настоящего времени способность МВ-ЦВ осуществлять доставку функционально активных биомолекул в клетки-реципиенты исследована не была. Мы оценили способность МВ-ЦВ доставлять генетический материал и функциональную активность доставленных молекул в клетке-реципиенте. Методами ПЦР и лазерной конфокальной микроскопии нами было показано, что МВ-ЦВ, полученные от клеток-доноров НЕК293FT, трансфицированных плазмидной ДНК рEGFP-N2, также несут молекулы плазмидной ДНК, которые они способны доставлять в клетки-реципиенты. При этом доставленный генетический материал (рEGFP-N2) способен выступать в качестве матрицы для транскрипции, о чем свидетельствует наличие экспрессии белка, кодируемого используемой в эксперименте генетической конструкцией (Рисунок 5).

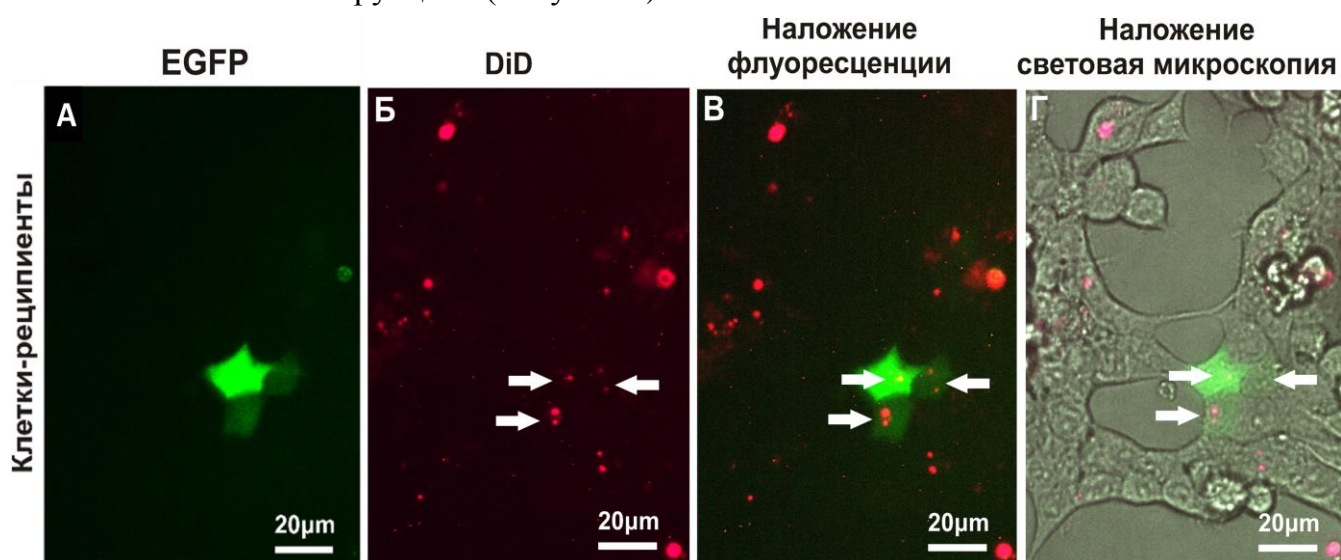


Рисунок 5 - Микрофотографии клеток-реципиентов НЕК293FT после нанесения мембранных везикул, полученных с помощью цитохалазина В (А-Г). Флуоресценция в зеленой области спектра – экспрессия рEGFP-N2; флуоресценция в красной области спектра – DiD (окрашивание ЦПМ). А-В - флуоресцентные микрофотографии; Г – наложение световая микроскопия. Клетки-реципиенты – клетки НЕК293FT, на которые наносили мембранные везикулы. \Rightarrow включение мембраны мембранных везикул в ЦПМ клетки-реципиента.

Известно свойство СК стимулировать регенерацию и ангиогенез (Martins et al. // Methods Mol Biol. 2014. V.1213.). Однако существует опасность применения СК в качестве инструмента клеточной терапии, связанная с возможностью

онкологической трансформации клеток при долговременной экспансии *in vitro* и генетической модификации (Baglio et al. // Front Physiol. 2012. V.3.), а также с дифференцировкой в нежелательном направлении (Breitbach et al. // Blood. 2007. V.110; Kunter et al. // J Am Soc Nephrol. 2007. V.18.). Использование МВ-ЦВ СК позволит избежать рисков, связанных с неограниченным клеточным ростом. Поэтому исследование биологической активности МВ-ЦВ представляет интерес. Так как частота опухолевой трансформации СК низка, оценить риск неограниченного роста и формирования опухоли затруднительно, поэтому в качестве модели клеток человека, обладающих повышенной ангиогенной активностью и опасностью неограниченного роста одновременно, мы использовали опухолевые клетки человека SH-SY5Y. Известно, что активно пролиферирующие опухолевые клетки требуют постоянного притока крови для своего питания и газообмена, поэтому для них характерна гиперэкспрессия позитивных регуляторов ангиогенеза и снижение экспрессии ингибиторов (Papetti et al. // Am J Physiol Cell Physiol. 2002. V.282; Gupta et al. // World J Gastroenterol. 2003. V.9.). С целью исследования биологической активности МВ-ЦВ, полученных от клеток человека с повышенной проангиогенной способностью, мы оценивали способность МВ-ЦВ опухолевых (SH-SY5Y) и стволовых клеток (МСК-ЖТ) стимулировать ангиогенез *in vitro* и *in vivo*. В результате проведенных нами исследований установлено, что МВ-ЦВ SH-SY5Y, стимулируют формирование капилляро-подобных структур HUVEC *in vitro* на матриксе Matrigel, подобно клеткам-донорам SH-SY5Y (Рисунок 6). При этом биологический эффект, оказываемый МВ-ЦВ, оказался сравним с эффектом от клеток SH-SY5Y ($43,5 \pm 3,53$ разветвления капилляро-подобной сети против $41,33 \pm 8,51$) (Рисунок 6). Методом иммуноблоттинга в составе МВ-ЦВ нами были обнаружены факторы роста VEGF и FGF2. Полученные данные позволяют сделать заключение, что МВ-ЦВ опухолевых клеток стимулируют формирование капилляро-подобных структур HUVEC *in vitro* на матриксе Matrigel путем доставки в клетки-реципиенты основных факторов роста, стимулирующих пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток и являющихся основными индукторами ангиогенеза – VEGF и FGF2 (Roy Choudhury et al. // J Oncol. 2012. V.2012.).

С целью исследования механизма паракринного действия СК мы исследовали и сравнили молекулярный состав МВ-ЦВ МСК-ЖТ и клеток-доноров МСК-ЖТ на наличие широкого спектра факторов роста, цитокинов, хемокинов. Согласно полученным данным, МВ-ЦВ МСК-ЖТ, подобно клеткам-донорам МСК-ЖТ, содержат все исследованные факторы роста: FGF2, SCGF- β , HGF, b-NGF; цитокины: IL-6; IL-9; IL-13; IL-15; IL-16; IL-18; IL-2Ra; IL-1b; SCF; GROa; LIF; STACK; MIF; IFN- α 2; TRAIL; GM-CSF и хемокины: IL-8; MCP-3; IP-10; MIG.

Таким образом, МВ-ЦВ МСК-ЖТ заключают цитоплазматическое содержимое клеток-доноров МСК-ЖТ и потенциально способны проявлять биологические свойства МСК-ЖТ.

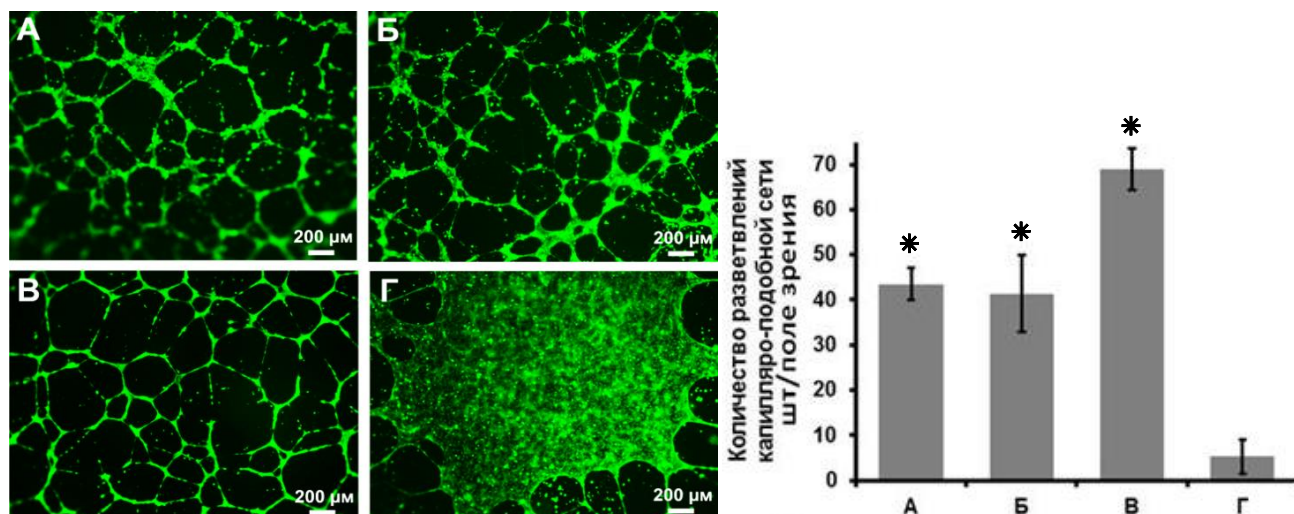


Рисунок 6 - Микрофотографии и диаграмма, отражающие количество разветвлений капилляро- подобной сети HUVEC *in vitro* на матриксе Matrigel. Флуоресценция в зеленой области спектра – Calcein. А – кокультивирование HUVEC и нативных клеток SH-SY5Y; Б – нанесение МВ-ЦВ SH-SY5Y на HUVEC; В – HUVEC в «богатой» среде; Г- HUVEC в «бедной» среде. * - образцы, достоверно отличающиеся от отрицательного контроля (значение $p < 0,01$).

В результате подкожного введения лабораторным животным *Rattus norvegicus* МВ-ЦВ или клеток SH-SY5Y/ МСК-ЖТ в матриксе Matrigel и последующего анализа трансплантированного матрикса, было обнаружено, что МВ-ЦВ SH-SY5Y/ МСК-ЖТ стимулировали прорастание в толщу матрикса кровеносных капилляров, плотность которых на единицу площади гистологического среза статистически значимо (значение $p < 0,01$) превышала контрольный образец (подкожная инъекция матрикса Matrigel) в 12,7 и 5,7 раз, соответственно (Рисунок 7). Это свидетельствует о наличии у МВ-ЦВ SH-SY5Y/ МСК-ЖТ способности стимулировать ангиогенез *in vivo*. Проангиогенная активность клеток SH-SY5Y /МСК-ЖТ была выше по сравнению с МВ-ЦВ SH-SY5Y / МСК-ЖТ в 1,8 и 1,96 раз, соответственно (Рисунок 7). Причиной наблюдаемого различия в ангиогенной активности между клетками-донорами и МВ-ЦВ является способность клеток к пролиферации в матриксе Matrigel, который содержит все белки естественного внеклеточного матрикса (Kleinman et al. // Semin Cancer Biol. 2005. V.15.). В результате, при подкожном введении в матриксе опухолевых клеток (SH-SY5Y) происходит заметное увеличение клеточной биомассы, что в конечном итоге может привести к развитию онкологического заболевания (Akbasak et al. // J Neurooncol.

1996. V.27.). В то время как МВ-ЦВ осуществляют лишь доставку заключенных внутри них веществ и не способны к делению и формированию опухоли.

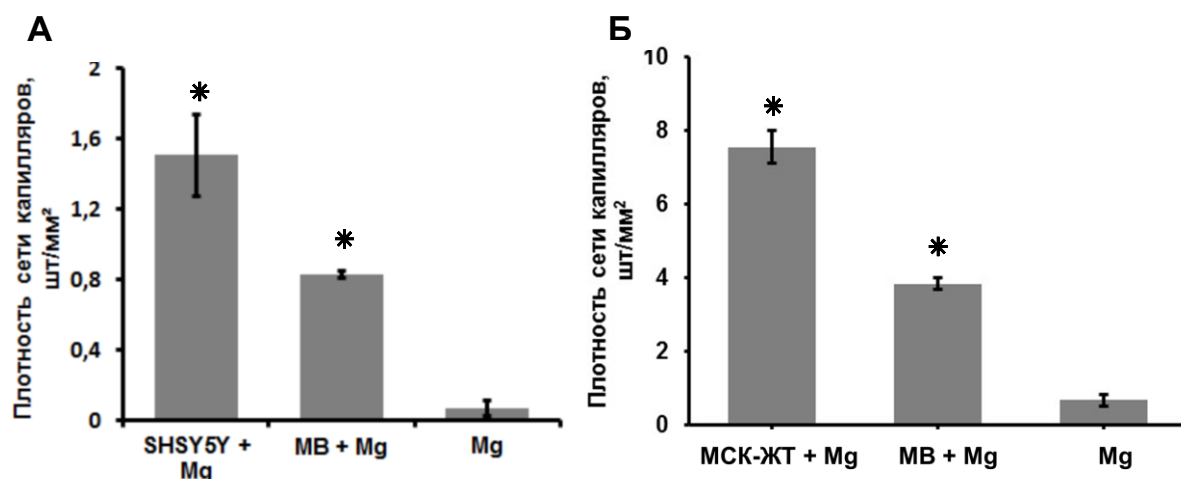


Рисунок 7 - Диаграммы, отражающие плотность капилляров в микросрезах введенного крысам подкожного матрикса Matrigel, содержащего клетки или МВ SH-SY5Y (А), клетки или МВ МСК-ЖТ (Б). Mg – матрикс Matrigel. * - образцы, достоверно отличающиеся от контроля (значение $p < 0,01$).

Такие свойства внеклеточных везикул, как отсутствие риска неконтролируемого деления и в то же время проявление биологической активности клеток-доноров, делают их перспективными инструментами бесклеточной терапии различных заболеваний. Так как одним из критериев применимости лекарственного препарата в медицинской практике является стабильность, исследование стабильности МВ-ЦВ представляло интерес. Методом СЭМ мы оценивали морфологию и целостность мембранных везикул, подвергнутых разным условиям хранения. Согласно полученным данным, после 14 суток хранения в физиологическом растворе, а также одного цикла замораживания/размораживания, большинство мембранных везикул сохраняют целостность. В результате лиофильного высушивания и последующей регидратации МВ-ЦВ, обнаружено формирование агрегатов, которые состоят из округлых структур – отдельных МВ-ЦВ. Формирование агрегатов в результате лиофилизации/регидратации было описано ранее для липосом (Bridges et al. // J Pharm Pharmacol. 2001. V.53.). То есть формирование агрегатов в результате лиофилизации/регидратации является общей реакцией окруженных липидным бислоем структур.

С целью исследования стабильности МВ-ЦВ во внутренней среде организма, мы инкубировали МВ-ЦВ в сыворотке крови человека. Согласно данным проточной цитофлуориметрии через 7 суток инкубации в сыворотке крови человека процент CFDA⁺ клеток-реципиентов снизился с $98 \pm 0,14\%$

(положительный контроль - нанесение МВ-ЦВ МСК-ЖТ сразу после выделения) до $79,1 \pm 3,8\%$. То есть происходит уменьшение процента клеток-реципиентов, в которые было доставлено содержимое МВ-ЦВ, в среднем на $2,7\%$ CFDA⁺-клеток-реципиентов в сутки. Хранение МВ-ЦВ МСК-ЖТ в физиологическом растворе при 25°C и 4°C приводит к уменьшению процента клеток-реципиентов, в которые было доставлено содержимое МВ-ЦВ, в среднем на $1,22\%$ и $0,34\%$ в сутки, соответственно, то есть процесс разрушения МВ-ЦВ оказался замедлен приблизительно в 4 раза при снижении температуры хранения до 4°C. Один цикл замораживания/размораживания и лиофильного высушивания/регидратации повлияли на целостность МВ-ЦВ (процент CFDA⁺ клеток-реципиентов снизился до $90,42 \pm 1,05\%$ и $94,87 \pm 0,68\%$, соответственно). При хранении МВ-ЦВ в замороженном или лиофилизированном виде при -20°C, процент клеток-реципиентов, в которые было доставлено содержимое МВ-ЦВ, снижался в среднем на $0,17\%$ или $0,07\%$ в сутки, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о постепенном снижении эффективности доставки содержимого МВ-ЦВ в клетки-реципиенты вследствие нарушения целостности МВ-ЦВ.

Условиями хранения, которые позволили сохранить МВ-ЦВ на долгий срок без значительной потери способности к доставке веществ клетке-реципиенту, являются хранение в физиологическом растворе при 4°C, а также замораживание и хранение при -20°C. В то время как лиофильное высушивание МВ-ЦВ МСК-ЖТ в чистом виде приводит к образованию агрегатов и поэтому не может быть использовано для обеспечения сохранности препарата МВ-ЦВ МСК-ЖТ. Однако имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что проблема формирования агрегатов уже успешно решена для синтетических липидных везикул – липосом, чья оболочка по химическому составу похожа на ЦПМ (Arshinova O.Yu. // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012. V.46; Moretton et al. // *J R Soc Interface*. 2012. V.9.). Поэтому можно предположить, что предварительная подготовка препарата МВ-ЦВ перед лиофильным высушиванием с применением известных криопротекторов, позволит в будущем решить проблему формирования агрегатов МВ-ЦВ.

Внеклеточные везикулы представляют собой идеальные вектора для доставки биоактивных молекул, так как являются естественными векторами, опосредующими межклеточную коммуникацию в организме человека (Lee et al. // *Hum Mol Genet*. 2012. V.21.). Полученные нами с помощью цитохалазина В МВ обладают размером сходным с естественными внеклеточными везикулами, что свидетельствует в пользу перспективности применения получаемых нами МВ-ЦВ в качестве векторной системы. Следует отметить, что содержимое МВ-ЦВ защищено

от деградации мембраной, которая липидным составом и поверхностными рецепторами повторяет ЦПМ клетки-донора. Обогащение МВ-ЦВ факторами роста позволяет предполагать, что они станут не только перспективной векторной системой, но и инструментом терапии ишемических заболеваний и повреждений.

ВЫВОДЫ

1. Мембранные везикулы, получаемые от клеток человека НЕК293FT с помощью цитохалазина В, обладают размером от менее чем 100 нм до 1800 нм с пиком в области 100-600 нм. В процессе образования мембранные везикулы заключают цитоплазматическое содержимое клеток-доноров, в том числе митохондриальную ДНК, фрагменты актинового цитоскелета, компоненты необходимые для поддержания биосинтеза белка.
2. Доставка внутреннего содержимого мембранных везикул, полученных с помощью цитохалазина В, в клетку-реципиента происходит двумя путями: 1) непосредственное слияние мембран; 2) эндоцитоз. Непосредственное слияние мембран приводит к встраиванию липидного компонента и трансмембранного белка CD90 мембранных везикул МСК-ЖТ в состав ЦПМ клеток-реципиентов НЕК293FT.
3. Мембранные везикулы, полученные с помощью цитохалазина В, способны к доставке в клетки-реципиенты плазмидной ДНК pEGFP-N2, которая способна служить матрицей для транскрипции и последующей трансляции в клетках-реципиентах.
4. Мембранные везикулы, полученные от клеток линии SH-SY5Y и МСК-ЖТ с помощью цитохалазина В, содержат биоактивные молекулы (факторы роста, цитокины, хемокины) и способны стимулировать формирование капилляро-подобных структур HUVEC на матриксе Matrigel *in vitro* и ангиогенез *in vivo*.
5. Установлено, что условиями, которые позволили сохранить целостность МВ-ЦВ МСК-ЖТ и способность к доставке своего содержимого в клетку-реципиента, являются хранение в физиологическом растворе при 4°C, а также замораживание и хранение при -20°C. Лиофильное высушивание МВ-ЦВ МСК-ЖТ в чистом виде приводит к образованию агрегатов и не может быть рекомендовано в качестве способа хранения МВ-ЦВ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 2 статьи в научных журналах рекомендованных ВАК, а также индексируемых в базе данных Scopus, 7 тезисов докладов на Международных и Всероссийских конференциях и конгрессах. Была подана заявка на выдачу патента на изобретение «Способ получения лекарственного препарата на основе везикул клеток человека» в раздел А61К согласно международной патентной классификации (уведомление о поступлении заявки №2015131280 от 27.07.2015).

1. Гомзикова М.О. Мембранные мировезикулы: биологические свойства и участие в патогенезе заболеваний / М.О. Гомзикова, Р.Ф. Гайфуллина, И.Г. Мустафин, В.М. Чернов, З.Р. Мифтахова, А.С. Галявич, А.А. Ризванов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2013. - Т.8, №1. - С.6-11 (перечень ВАК), автора – 0,4 пл.
2. Гомзикова М.О. Детекция микоплазменной контаминации в культурах клеток млекопитающих / М.О. Гомзикова, Музыкантов А.А., Чернов В.М., Ризванов А.А. // КТТИ 2012г. - т.8 - №3 - С.16-17 (перечень ВАК), автора – 0,1 пл.
3. Гомзикова М.О. Получение и характеристика искусственных микровезикул из генетически модифицированной культуры клеток человека / М.О. Гомзикова, С.К. Расулова, А.А. Ризванов // Сборник трудов IV международной научно-практической конференции "Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине" / К(П)ФУ. - Казань, 2014. - 160 с., автора – 0,1 пл.
4. Гомзикова М.О. Влияние искусственных микровезикул и инактивированных клеток нейробластомы человека SH-SY5Y на ангиогенез / М.Н. Катина, А. Яковлева, К. Яковлева, А.А. Ризванов // Сборник трудов IV международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» / К(П)ФУ. - Казань, 2014. - 157 с., автора – 0,1 пл.
5. Гомзикова М.О. Использование микровезикул в качестве новой векторной системы для доставки терапевтических препаратов / Яковлева А., Яковлева К., Расулова С.К., Ризванов А.А. // Сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции "Актуальные вопросы образования и науки". - 2014. - С.43-45., автора – 0,2 пл.
6. Гомзикова М.О. Разработка терапевтической системы на основе искусственных микровезикул клеток человека для стимуляции ангиогенеза / М.О. Гомзикова, А.А. Ризванов // Биология - наука XXI века: 19-я Международная

Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 21-24 апреля 2015 г.).
Сборник тезисов. - Пушино. - 2015. - С.63-64., автора – 0,125 пл.

7. Gomzikova M.O. The development of biosafety tool for stimulating angiogenesis based on microvesicles from cells with enhanced ability to stimulate angiogenesis / M.N.Zhuravleva, A.A. Rizvanov // Abstracts of 18th symposium for biology students in Europe "Symbiose". – 2015. - P.20, автора – 0,1 пл.

8. Гомзикова М.О. Исследование свойств мембранных везикул, полученных с помощью цитохалазина В из клеток человека НЕК293 / М.О. Гомзикова, А.А. Ризванов // Гены и клетки. - 2015. - Т.10, №3. - С.27-32 (перечень ВАК), автора – 0,4 пл.

9. Гомзикова М.О. Анализ размера внеклеточных везикул клеток человека разными методами / М.О. Гомзикова, С.К. Расулова, А.А. Ризванов // Альманах мировой науки. - 2015. - №2-1(2). - С. 74-75, автора – 0,125 пл.

Список сокращений

CFDA SE (англ. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) - карбоксифлуоресцеин диацетат сукцинимидил эфир

DMEM (англ. Dulbecco's modified Eagle's medium) - модифицированная Дульбекко среда Игла

EGFP (англ. Enhanced green fluorescence protein) – улучшенный зеленый флуоресцентный белок

FBS (англ. Fetal bovine serum) - сыворотка крови плодов коровы

FGF2 (англ. Fibroblast growth factor-2) - фактор роста фибробластов

НЕК 293FT (англ. human embryonic kidney 293 cells) – линия эмбриональных клеток почки человека

HGF (англ. Hepatocyte growth factor) - фактор роста гепатоцитов

HUVEC (англ. Human umbilical vein endothelial cells) - эндотелиальные клетки пупочной вены человека

IGF-1(англ. Insulin-like Growth Factor) - инсулиноподобный фактор роста

VEGF (англ. Vascular Endothelial Growth Factor) - фактор роста эндотелия сосудов

АТФ - аденозинтрифосфат

МВ – мембранные везикулы

МВ-ЦВ - мембранные везикулы, получаемые с помощью цитохалазина В

МСК – мезенхимные стволовые клетки

МСК-ЖТ - мезенхимные стволовые клетки из жировой ткани

ЦПМ – цитоплазматическая мембрана

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание КФУ, к. 105, отдел
аттестации научно-педагогических кадров, e-mail: RGDzjubenko@kpfu.ru, факс
8(843)233-78-67. Диссертационный совет Д212.081.08. Ученый секретарь Абрамова
Зинаида Ивановна. Факс 8(843)238-76-01.
E-mail автора: gomzikova.marina.o@gmail.com

Формат 60x84/16. Гарнитура Таймс. Бумага офсетная №1
Печать RISO. Уч.-изд.л. 1,2. Тираж 100 экз.
ЦЕНТР ПЕЧАТИ “Линк”. Казань, ул. Карла Маркса, 51